

JP62232392A**MicroPatent Report****PRODUCTION OF L-THEREONINE AND L-ISOLEUCINE**

[71] **Applicant:** KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

[72] **Inventors:** KATSUMATA RYOICHI;
MIZUKAMI TORU;
HARA MASAKO;
KIKUCHI YASUHIRO . . .

[21] **Application No.:** JP61076298

[No drawing]

[22] **Filed:** 19860402

[43] **Published:** 19871012

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To improve the productivity of L-threonine or L- isoleucine, by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus, etc., in a medium and producing L-threonine or L-isoleucine in the medium. CONSTITUTION: L-threonine or L-isoleucine is produced and accumulated in a medium by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus having a recombinant DNA of a vector DNA and a DNA fragment carrying a genetic information participating in the synthesis of homoserine dehydrogenase and homoserine kinase of a microorganism belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus. The produced amino acid is separated from the culture product. COPYRIGHT: (C)1987, JPO&Japio

[51] **Int'l Class:** C12P01308 C12N00120 C12N01500 C12P01306

C12P01308 C12R00115 C12P01308 C12R00113 C12N00120 C12R00115
C12N00120 C12R00113 C12P01306 C12R00115 C12P01306 C12R00113

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭62-232392

⑫ Int.Cl.⁴

C 12 P 13/08
C 12 N 1/20
C 12 N 15/00
C 12 P 13/06

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月12日

C-7236-4B
7115-4B
7115-4B
C-7236-4B

*審査請求 未請求 発明の数 7 (全12頁)

⑭ 発明の名称 L-ースレオニンおよびL-イソロイシンの製造法

⑮ 特願 昭61-76298

⑯ 出願 昭61(1986)4月2日

⑰ 発明者 勝亦 瞳一 町田市成瀬2-12-3 ポプラ丘コーポ6-401

⑰ 発明者 水上 透 町田市旭町2-14-10

⑰ 発明者 原 雅子 座間市相模が丘5-40-11

⑰ 発明者 菊池 泰弘 町田市中町3-9-9

⑰ 発明者 岡 儀夫 横浜市緑区奈良町2360-17

⑰ 出願人 協和酵素工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

L-ースレオニンおよびL-イソロイシンの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-ースレオニンまたはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-ースレオニンまたはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-ースレオニンおよびL-イソロイシンの製造法。

(2) ベクターが、コリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属に属する微生物内で複製可能なpCG1, pCG2, pCG4, pCG11, pCE51, pCE52, pCE53, pCE54, pCB101およびそれらから導かれるプラスミドから選ばれる特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物由来のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片が、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する宿主微生物にスレオニンまたはイソロイシンのアノログに対する耐性を付与することができるDNA断片であることを特徴とする組換え体DNA。

(4) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物由来のホモセリンデヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物。

(5) 第3表で示されるホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

(6) 第3表で示されるホモセリンキナーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

(7) リジンを生産する能力を有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物に、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のホモセリンデ

ヒドロゲナーゼおよびホモセリンキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片を含む組換えDNAを導入し、得られる形質転換株を培地に培養し、培養物中にL-スレオニンまたはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-スレオニンまたはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法。

(8) 第3表のDNA配列において、ホモセリンデヒドロゲナーゼあるいはホモセリンキナーゼをコードするオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流にある120塩基配列およびホモセリンキナーゼをコードするオープン・リーディング・フレームの開始コドンの下流にある60塩基配列またはそれらの一部を含む、コリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属に属する微生物で外来遺伝子を発現させるのに必要なDNA配列。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のスレオニン生合成に関与するホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下HDと略す）とホモセリンキナーゼ（以下HKと

略す）の両酵素をコードする遺伝子を含む組換えDNAをコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物に保有させ、該微生物を培地に培養し、培養物中に生成蓄積したL-スレオニンあるいはL-イソロイシンを採取することを特徴とするL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法に関する。従って、本発明はバイオインダストリーの産業分野に係り、特に、医薬、食品および飼料工業において有用なL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造分野に関する。

従来の技術

コリネバクテリウム属やプレビバクテリウム属などの微生物を用いる発酵法によるL-スレオニンおよびL-イソロイシンを生産する方法については、該菌種の野生株から誘導された突然変異株を用いる方法がよく知られている。L-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産性変異株としては、アミノ酸の栄養要求性変異やアミノ酸のアナログに対する耐性変異あるいはそれらの変異を共有する菌株が知られており、例えば、特開昭47-19087や特公昭54-32070などに記載されている。一方、このような突然変異の付与により育種された菌株とは別に、組換えDNA技術

により育種された菌株を用いるL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法も知られている。例えば、大腸菌のスレオニン生合成に係わる酵素の遺伝情報を担うDNA断片を含む組換え体プラスミドDNAをコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種に保有させ、該菌株を用いてL-スレオニンあるいはL-イソロイシンを発酵生産する方法が開示されている（特開昭58-126789および特開昭60-30693）。また、プレビバクテリウム属菌株のHDをコードする遺伝子（以下HD遺伝子ともいう）を含む組換え体プラスミドDNAを保有するコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種によるL-スレオニンおよびL-イソロイシンの製造法も開示されている（特開昭60-12995）。

発明が解決しようとする問題点

近年、L-スレオニンおよびL-イソロイシンに対する需要が増大するにつれ、これらのアミノ酸の製造法の改良がますます望まれている。本発明者らは、この課題に対処するために、組換えDNA技術によりコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種のL-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産能力を向上させるべく研究を行った。

問題点を解決するための手段

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のL-スレオニン生合成に係わる酵素のうち、HDとHKの遺伝情報を同時に含む組換え体プラスミドDNAをコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種由来の遺伝子を含む組換え体プラスミドDNAを用いるL-スレオニンあるいはL-イソロイシン生産菌としては、前記のごとくHD遺伝子を適用した例が知られているが、HD遺伝子とHKをコードする遺伝子（以下HK遺伝子ともいう）の両遺伝子を使用した例は知られておらず、両遺伝子を含む組換え体DNAがL-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産性に顕著に寄与することは、本発明により初めて見出されたものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のHDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片とベクターDN

Aとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-スレオニンあるいはL-イソロイシンを生成蓄積させ、該培養物からL-スレオニンまたはL-イソロイシンを採取することにより、高収率でL-スレオニンまたはL-イソロイシンを製造することができる。

宿主微生物として用いるコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種としては、コリネ型グルタミン酸生産菌として知られる微生物は全て用いることができるが、好適には下記の菌株が使用される。

コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 31833
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 13032
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC 13868
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
プレビバクテリウム・ディバリカツム	ATCC 14020

始源となる微生物としては、コリネ型グルタミン酸生産菌でHDおよびHK活性を有するものであればいかなる微生物でもよく、例えばコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物の野生株あるいはそれから誘導したL-リジン、L-スレオニンまたはL-イソロイシン生産性変異株を用いることができる。これらの菌株の染色体DNAは、本発明者らが特開昭58-126789に示したように、培養中にペニシリン処理した菌体をリゾチームおよび界面活性剤で処理して沈殿した後、常法で除蛋白し、次いでエタノールで沈殿させることにより単離できる。

染色体DNAからHDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片を組み込むためのベクターとしては、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種中で自律複製できるものであれば特に限定されないが、例えば本発明者らが開発したpCG1(特開昭57-134500)、pCG2(特開昭58-35197)、pCG4、pCG11(いずれも特開昭57-183799)、pCE54、pCB101(いずれも特開昭58-105999)、pCE51(特開昭60-34197)およびpCE52、pCE53(いずれもモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジ

プレビバクテリウム・フラブム

ATCC 14067

プレビバクテリウム・イマリオフィラム

ATCC 14068

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム

ATCC 13869

プレビバクテリウム・チオゲニタリス

ATCC 19240

宿主微生物としては、L-スレオニンまたはL-イソロイシン非生産性の菌株を用いることもできるが、好ましくはL-スレオニン、L-イソロイシンまたはL-リジン生産性を有する菌株を用いる。L-スレオニン、L-イソロイシンまたはL-リジン生産性を有する菌株は、アミノ酸要求性変異、アナログ耐性変異またはこれらの変異を組み合わせる公知の変異誘導法によって造成できる〔プレスコット・アンド・ダンズ・インダストリアル・ミクロバイオロジィ(PRESCOTT and DUNN'S INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)第4版、ジョン・リード(G. Reed)編、ザ・エー・ヴィ・アイ・パブリッシング・カンパニー(The AVI Publishing Company Inc. Conn.)1982. PP.748-801. ケイ・ナカヤマ(K. Nakayama)〕。

本発明において、HDおよびHK両遺伝子の供

ネティクス(Mol. Gen. Genet.) 196, 175 (1984)などのプラスミドを使用することができる。プラスミドベクターは、本発明者らが特開昭57-134500あるいは特開昭57-183799に開示したように、菌体をリゾチームおよび界面活性剤で溶菌後、クリヤード・ライゼートを調製し、ポリエレンゲリコールでDNAを沈殿させ、しかし後にセシウムクロライド-エチジウムプロマイド密度勾配遠心にかけ、CCC-DNAとして単離精製することができる。

HDおよびHK両遺伝子を含むDNA断片とベクタープラスミドとの組換え体は、染色体DNAとベクタープラスミドを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで処理するか、あるいはその切断末端をターミナルトランスフェラーゼやDNAポリメラーゼなどで処理した後、DNAリガーゼを作用させて結合するなどの常法〔メソップ・イン・エンチモロジィ(Methods in Enzymology), 66(1979)〕により、種々の組換え体混成物とともに生成せしめることができる。

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の菌株から通常の変異操作によって誘導したホモセリン(あるいはメチオニンとスレオニン)要求性のHD欠損変異株またはスレオニン要求性

でホモセリンを分泌生産するHK欠損変異株を上記組換え体混成物を用いて形質転換し、ホモセリンまたはスレオニンに対して非要求性となった形質転換株を選択することによって、HDおよびHK両遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミドを取得することができる。コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌株の形質転換法としては、本発明者らが開発したプロトプラストを用いる方法(特開昭57-186492および特開昭57-186489、具体的には実施例に示す)により実施することができる。かくして得られた組換え体プラスミドDNAの中から、HD欠損変異株とHK欠損変異株を再度形質転換したとき両株の欠損形質を復帰させるものを選ぶことにより、HDおよびHK両遺伝子を含む組換え体プラスミド入手することができる。

以上のようにしてコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種の野生株の染色体DNAを供与源とした場合には、野生型のHDおよびHK両遺伝子を含む組換え体が得られ、これをコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種に保有させ、L-スレオニンまたはL-イソロイシンの生産性を向上させることができる。しかしながら、コリネバクテリウム属またはブレビ

バクテリウム属菌種において、スレオニン合成に係わるHDはスレオニンでフィードバック阻害を受け、スレオニン合成を制御することが知られている[アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリィ(Agr. Biol. Chem.)、38(5), 993(1974)]ので、この阻害から解除された変異型のHDをコードする遺伝子を有する組換え体プラスミドを用いる方がL-スレオニンおよびL-イソロイシンの生産性は高まる。

このような変異型のHD遺伝子を含む組換え体プラスミドは、アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリィ(Agr. Biol. Chem.)、38(5), 993(1974)に記載されているように、スレオニンのアナログ例えば α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸(以下AHVと略す)に耐性となった変異株、すなわちHD活性のスレオニンによる阻害が解除された菌株を分離し、その染色体DNAを供与源として、野生型の遺伝子から出発したと同様な方法で取得できる。あるいは野生型の遺伝子を含む組換え体プラスミドを保有するコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種を常法通り変異処理し、スレオニンアナログ耐性を付与することによっても、スレオニンによる阻害を受けなくなったHD遺伝子を含む組換え体プラス

ミドを調製できる。

野生型あるいは変異型のHDおよびHK遺伝子を含む組換え体プラスミドは、前記のごときプロトプラストを用いる形質転換法によりコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属微生物に導入できる。これらの組換え体プラスミド保有株によるL-スレオニンまたはL-イソロイシンの生産は、従来の発酵法によるL-スレオニンまたはL-イソロイシン製造に用いられる培養方法により行うことができる。すなわち、該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地で、好気的条件下、温度、pHなどを調節しつつ培養を行えば、培養物中にL-スレオニンまたはL-イソロイシンが生成蓄積するのでこれを採取する。

炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜などの炭水化物、ポリアルコール、ビルピン酸、フマル酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸が使用できる。さらに微生物の資化性によって、炭化水素、アルコール類なども用いることができる。特に醸造室は好適に用いられる。

窒素源としてはアンモニアあるいは塩化アンモ

ニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類あるいは尿素および他の窒素含有物ならびにペプトン、N-Z-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステーブ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、蛹加水分解物などの窒素含有物など種々のが使用可能である。

さらに無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどを使用する。微生物の生育に必要とするビタミン、アミノ酸源などは、前記したような他の培地成分によって培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は振盪培養あるいは通気搅拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は一般に20~40℃が好適である。培地のpHは中性附近に維持することが望ましい。培養期間は通常1~5日間で培地にL-スレオニンおよび/またはL-イソロイシンが蓄積する。培養終了後、菌体を除去して活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法で培養液からL-スレオニンおよび/またはL-

ーイソロイシンを回収する。

かくしてコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のHDおよびHK両遺伝子を含む超換え体プラスミドを保有させたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の微生物を用いることにより、高収率でL-アラニンおよび/またはL-イソロイシンを生産することができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例

(1) コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833の染色体DNAとベクターpCE54の調製

NB培地(粉末ブイヨン20g, 酵母エキス5gを純水1lに含み, pH7.2に調整した培地)で増殖したコリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833の種培養を40mlの半合成培地SSM(グルコース20g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, 尿素3g, 酵母エキス1g, KH₂PO₄ 1g, MgCl₂·6H₂O 0.4g, FeSO₄·7H₂O 1.0mg, MnSO₄·4·6H₂O 0.2mg, ZnSO₄·7H₂O 0.9mg, CuSO₄·5H₂O 0.4mg, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.09mg, (NH₄)₂MoO₄·

ラスマドpCG2(特開昭58-35197)とエシェリシア・コリのプラスミドpGA22(ジャーナル・オブ・バクテリオロジィ(J. Bacteriol.) 140, 400 (1979))を連結せしめたプラスミドである。詳しくはpCG2とpGA22の各々1ヶ所しかないPstI切断部位で両者を和合連結したプラスミドである(第1図参照)。このpCE54はその保有株コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 39019(ATCC 31833から誘導したリゾーム感受性変異を有する菌株)の培養菌体から次の方法で単離した。

400mlNB培地で30℃で振盪培養し、OD約0.7になるまで生育させた。菌体を集団しTES緩衝液で洗浄後、リゾーム溶液1.0mlに懸濁し、37℃で2時間反応させた。反応液に5M NaCl 2.4ml, 0.5M EDTA(pH8.5) 0.6ml, 4%ラクリル硫酸ナトリウムと0.7M NaClからなる溶液4.4mlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水上に15時間置いた。溶液を遠心管に移し、4℃で60分間69,400×gの遠心分離にかけ上澄液を回収した。これに重量百分率10%相当のポリエチレンリコール(pEG) 6,000

4H₂O 0.04ml, ビオチン 3.0μgおよびサイアミン塩酸塩1mgを水1lに含み、pH7.2に調整した培地)に接種して30℃で振盪培養した。東京光電比色計で660nmにおける吸光度(OD)を測定し、ODが0.2になった時点で培養液中0.5単位/mlの濃度となるようにペニシリングを添加した。さらに培養を繼續し、ODが0.6になるまで生育させた。

培養液から菌体を集団し、TES緩衝液[0.03Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下トリスと略す), 0.005M EDTA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム), 0.05M NaCl, pH8.0]で洗浄後、リゾーム溶液(25%ショ糖, 0.1M NaCl, 0.05Mトリス, 0.8mg/mlリゾーム, pH8.0, 以下同じ)10mlに懸濁し、37℃で4時間反応を行った。集団した菌体から齊藤らの方法[Saito, H. et al. :バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta), 72, 619 (1963)]に従って高分子染色体DNAを単離した。

ベクターとして用いたpCE54(特開昭58-105999)は、本発明者らが先に特許出願したコリネバクテリウム・グルタミクムの

(半井化学药品社製)を加え、静かに混和して溶解後、氷水上に置いた。10時間後、1.500×gで10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから1.5mg/mlエチジウムプロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を1.580に合わせた。この溶液を105.000×g, 18℃で48時間超速遠心分離にかけ、紫外線照射下に検知される遠心チューブ下方の密度の高い位置のバンドを遠心チューブの側面から注射器で抜きとることによってpCE54プラスミドDNAを分離した。この分画液を等容量のイソプロピルアルコール液(容量百分率90%イソプロピルアルコール, 10%TES緩衝液(この溶液中に飽和溶解度の塩化セシウムを含む))で5回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、しかし後にTES緩衝液に対して透析した。

(2) HD遺伝子とHK遺伝子を含むDNA断片のクローニング

上記で調製したpCE54プラスミドDNA 3μgを含む制限酵素SalI用反応液(トリス10mM, MgCl₂, 6mM, NaCl 200mM, pH7.5) 60μlに6単位の

Sa I (宝酒造社製) を添加し、37℃で60分間反応後、65℃で10分間加温して反応を停止させた。一方、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833 の染色体 DNA 8 μg を含む *Sa* I 用反応液 140 μl に4単位の *Sa* I を添加し、37℃で60分間反応後、65℃で10分間加温して反応を停止させた。

両反応物を混合し、10倍濃度の T4 リガーゼ用緩衝液 (トリス 660 mM, MgCl₂, 66 mM, ジチオスレイトール 100 mM, pH 7.6) 40 μl, 5 mM ATP 40 μl, T4 リガーゼ (宝酒造社製, 1単位/μl) 0.3 μl および純水 120 μl を加え、12℃で16時間反応させた。

このリガーゼ反応混合物をコリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833 由来のリゾチーム感受性変異株から誘導された K53 株 [本菌株はホモセリン要求性 (HD欠損) とロイシン要求性の変異を有している] の形質転換に供した。K53 株は昭和 60 年 5 月 23 日付で工業技術院微生物工業技術研究所 (微生物) に FERM P-8257 として寄託してある。形質転換には次のように調製されるプロトプラ

次いで TSMC 緩衝液中に 20% PEG 6000 を含む液 0.8 ml を添加して混合した。3 分後、RCGP 培地 (pH 7.2) 2 ml を添加し、2.500 × g で 5 分間遠心分離にかけて上澄液を除去し、沈降したプロトプラストを 1 ml の RCGP 培地に懸濁してから、0.2 ml をカナマイシン 300 μg/ml を含む RCGP 寒天培地 (RCGP 培地に 1.4% 寒天を含む培地, pH 7.2) に塗抹し、30℃で 7 日間培養した。

寒天培地上に生育したコロニーをかき集め、生理食塩水で 2 回遠心洗浄後、生理食塩水 1 ml に懸濁した。この菌液をロイシン 50 μg/ml およびカナマイシン 20 μg/ml を含有する最少寒天培地 M1 [グルコース 1.0 g, NH₄H₂PO₄ 1 g, KC₂O 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, FeSO₄ · 7H₂O 1.0 mg, MnSO₄ · 4~6H₂O 0.2 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0.9 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.09 mg, (NH₄)₂MoO₄ · 4H₂O 0.04 mg, ピオチン 50 μg, D-アミノ安息香酸 2.5 mg, サイアミン塩酸塩 1 mg および寒天 1.6 g を 1 l 中に含み、pH 7.2 に調整した培地] 上に再塗布して 30℃で 3 日培養し、ホモセリン非要求性でカナマ

ストを用いた。K53 株の種培養を NB 培地に種培養して 30℃で振盪培養し、OD が 0.6 になった時点で要菌した。菌体を RCGP 培地 [グルコース 5 g, カゼミノ酸 5 g, 酵母エキス 2.5 g, K₂HPO₄ 3.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.41 g, FeSO₄ · 7H₂O 1.0 mg, MnSO₄ · 4~6H₂O 2 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0.9 mg, (NH₄)₂MoO₄ · 4H₂O 0.04 mg, ピオチン 30 μg, サイアミン塩酸塩 2 mg, コハク酸二ナトリウム 135 g, ポリビニルピロリドン (分子量 10,000) 30 g を水 1 l に含む培地] に 1 mg/ml のリゾチームを含む培液 (pH 7.6) に約 10⁶ 細胞/ml となるように懸濁し、L 型試験管に移して 30℃で 5 時間緩やかに振盪反応してプロトプラスト化した。

このプロトプラスト菌液 0.5 ml を小試験管にとり、2.500 × g で 5 分間遠心分離し、TSMC 緩衝液 (MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 3.0 mM, トリス 5.0 mM, ショ糖 4.00 mM, pH 7.5) 1 ml に再懸濁して遠心洗浄後、TSMC 緩衝液 0.1 ml に再懸濁した。この菌液に 2 倍濃度の TSMC 緩衝液と上記リガーゼ反応液の 1 対 1 混合液 1.00 μl を加えて混和し、

イシンに耐性となった形質転換株を選択した。

これらの形質転換株を NB 培地で培養し、その菌体から上記(1)で pCE54 を単離したのと同様な方法でプラスミド DNA を単離した。

形質転換株の一株から得られ、pChom1 と命名したプラスミドは、各種制限酵素での消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、pCE54 の唯一の *Sa* I 切断部位に 3.6 キロベースの *Sa* I DNA 断片が挿入されたプラスミドであることがわかった。この *Sa* I 切断片は第 1 図に示すような位置に 2ヶ所の *Pst* I 切断部位と 1ヶ所の *Eco* RI 切断部位を有していた。

pChom1 DNA を用い、上記と同様な方法で K53 株のプロトプラストを形質転換し、カナマイシン耐性で選択された形質転換株は、同時にホモセリン非要求性を示し、それから単離されたプラスミドは pChom1 と同一の構造を有していた。このことからコリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833 の HD 遺伝子が pChom1 上にクローニングされていることが明らかとなった。

HK 遺伝子が pChom1 上に存在することは次のように確認した。pChom1 DNA を

用いてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833から誘導したスレオニン要求性でホモセリン生産性のHK欠損変異株K54（本菌株は昭和60年5月23日付で微生物研にFERM P-8258として寄託している）のプロトプラストを形質転換した。本株のプロトプラストは以下のようにベニシリン処理菌体から調製した。NB培地での培養0.1mlをスレオニン100μg/mlを含む10mlのSSM培地に接種し30℃で振盪培養した。ODが0.15になった時点で0.45単位/mlとなるようにベニシリンGを添加した。さらに培養を続けるODが0.6になったところで集菌し、以後前記でK53株のプロトプラストを調製したのと同様な方法でリゾーム処理してプロトプラスト化した。形質転換も前記と同様に行い、カナマイシン300μg/mlを含むRCGP寒天培地で形質転換株を選択した。カナマイシン耐性形質転換株は同時にスレオニン非要求性であった。

この形質転換株を400ml SSM培地で振盪培養し、ODが0.2になったところで0.5単位/mlとなるようにベニシリンGを添加し、さらにOD約0.6まで培養し、集菌した菌体から上記(1)で記載したのと同じ方法で溶菌し、塩化セ

遁心洗浄し生理食塩水に懸滴した。菌懸滴液をカナマイシン20μg/mlとD-アミノ-β-ヒドロキシ吉草酸（以下AHVと略す）6mg/mlを含む最少寒天培地M1に塗抹して30℃で3日間培養した。出現した1つのコロニーを純化後、前記と同様にして培養菌体からプラスミドを単離し、このプラスミドをpChom10と命名した。

pChom1あるいはpChom10を保有するK53株の培養菌体を生理食塩水で遠心洗浄後、約10⁸細胞相当の菌をAHV2mg/ml、4mg/mlおよび6mg/mlを含む最少寒天培地M1に塗抹し、両株のAHV耐性度を比較した。30℃で3日間培養した結果、pChom1保有株はAHV2mg/mlを含有するM1寒天培地で生育したが、4mg/mlを含む寒天培地では生育できなかった。一方、pChom10保有株はAHV6mg/mlを含有するM1寒天培地でも生育した。

pChom10は、各種制限酵素での切断解析の結果、pChom1と同一の構造を有しており、スレオニン要求性のHK欠損変異株K54の相補能も保持していた。

シウムーエチジウムプロマイド密度勾配遠心でプラスミドを単離した。このプラスミドを各種制限酵素消化後、アガロースゲル電気泳動で解析した結果、pChom1と同一のプラスミドであることが確認された。

以上の結果からpChom1としてクローニングされた3.6キロベースのSal I DNA切断片にはHDおよびHK遺伝子が存在していることが判明した。

pChom1上にクローニングされた3.6キロベースのSal I 切断片の代表的な制限酵素に対する切断地図を第2図に示した。

(3) 宿主菌に高度のD-アミノ-β-ヒドロキシ吉草酸耐性を与える変異型プラスミドの作製

pChom1を保有するK53株をカナマイシン25μg/mlを含むNB培地で対数増殖の後期まで増殖させた。菌体を50mMトリス・マレイン酸緩衝液(pH6.0)で2回遠心後、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン400μg/mlを含む50mMトリス・マレイン酸緩衝液(pH6.0)に懸滴し室温で30分間処理した。処理菌体を同じ緩衝液で2回遠心洗浄後、NB培地に懸滴し30℃で2時間振盪培養した。培養菌体を生理食塩水で2回

(4) pChom1あるいはpChom10を導入した菌株によるスレオニンの生産

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869およびリジン生産性菌株ブレビバクテリウム・ラブムATCC21475（チアリジン耐性）をpChom1およびpChom10で形質転換した。プロトプラストは上記(2)でK54株のプロトプラストを調製したのと同様の方法で調製した。即ち、SSM培地での培養中途でベニシリンG(0.45単位/ml)を添加して処理した培養菌体をリゾーム処理して調製した。プロトプラストをプラスミドDNA1μgを用いて前記と同様の方法で形質転換し、RCGP寒天培地でカナマイシン耐性の形質転換株を選択した。形質転換株から、上記(2)でK54株のpChom1形質転換株からプラスミドを単離したのと同様の方法で、プラスミドを単離し、各種制限酵素での切断解析により、形質転換株がpChom1あるいはpChom10を保有することを確認した。

形質転換株と各々の親株のスレオニン生産試

試を次のように行った。NB培地で30℃、16時間振盪培養した種培養0.5mlを生産培地〔グルコース100g, (NH₄)₂SO₄ 20g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 1g, FeSO₄·7H₂O 10mg, MnSO₄·4~6H₂O 10mg, ビオチン100μgおよび炭酸カルシウム20gを水1Lに含み、pH7.2に調整した培地〕5mlの入った試験管に接種し、30℃で12時間振盪培養した。培養後、培養液をペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン発色による比色定量法によりジースレオニン生成量を測定した。結果を第1表に示す。

第 1 表

菌 株	ジースレオニン生成量 (g/L)
コリオバクテリウム・グルタミクム ATCC31833	0
同 ATCC31833/pChom1	0.4
同 ATCC31833/pChom10	1.9
コリオバクテリウム・ルーキュラス ATCC13868	0
同 ATCC13868/pChom1	0.6
同 ATCC13868/pChom10	2.2
ブレピオバクテリウム・ラクトファーマンダム ATCC13869	0
同 ATCC13869/pChom1	0.3
同 ATCC13869/pChom10	1.7
ブレピオバクテリウム・フラブル ATCC21475	0
同 ATCC21475/pChom1	0.4
同 ATCC21475/pChom10	5.2

(5) pChom1あるいはpChom10を導入した菌株によるイソロイシンの生産

上記(4)と同様の方法でコリオバクテリウム・グルタミクム FERM P-7160, ブレピバクテリウム・フラブル ATCC14067およびリジン生産性菌株コリオバクテリウム・グルタミクム FERM BP-158を形質転換

し、pChom1とpChom10の形質転換体を得た。形質転換体がプラスミドを保有することは前記と同様にして確認した。親株と形質転換株のイソロイシン生産試験を上記(4)と同一条件で行った。

その結果を第2表に示す。

第 2 表

菌 株	イソロイシン生産量 (g/L)
コリオバクテリウム・グルタミクム FERM P-7160	1.2
同 FERM P-7160/pChom1	2.6
同 FERM P-7160/pChom10	5.3
ブレピオバクテリウム・フラブル ATCC14067	0
同 ATCC14067/pChom1	0.6
同 ATCC14067/pChom10	3.7
コリオバクテリウム・グルタミクム FERM BP-158	0
同 FERM BP-158/pChom1	0.9
同 FERM BP-158/pChom10	4.8

(6) HDおよびHK両遺伝子のサブクローニング
第2図のSma I切断部位から3ヶ所あるPvu II切断部位のうちの右端の切断部位にいたる切断片（太い黒線部分）を含む組換え体ブ

ラスミドを次のようにして取得した。

pCE54プラスミドDNA 1μgを含むEcoRI用反応液（トリス100mM, MgCl₂ 6mM, NaCl 50mM, pH 7.5）20μlにEcoRI（宝酒造社製）を3単位添加し、37℃で60分間反応後、70℃で15分間加温して反応を停止させた。これにデオキシATPとデオキシTTPを各0.05mM添加し、大腸菌DNAポリメラーゼIラージフラグメント（宝酒造社製）を3単位加え、37℃で30分間反応させ、70℃で15分間加温して反応を停止させた。

一方、pChom1プラスミドDNA 3μgを含むSma I用反応液（トリス10mM, KCl 20mM, MgCl₂ 6mM, pH 7.5）20μlにSma I（宝酒造社製）を3単位およびPvu II（宝酒造社製）を1単位添加し、37℃で60分間反応させた。反応物中から、モレキュラー・クローニング（コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリリー, 1982) 164頁に記載されている方法を用いて、2.6キロベースのDNA切断片を分画、精製した。すなわち、反応物をアガロースゲル電気泳動にかけ、2.6キロベースのバンドを切り出し、透析膜中

で電気泳動することによりゲルからDNA切断片を抽出した。抽出液に3倍量のエタノールを添加し、-80℃、10分間冷却したのち、遠心により沈殿を集めた。真空中でエタノールを蒸発させ、20μlのEco RI用反応液に溶解した。

両反応物を混合し、5mM ATPを5μlとT4リガーゼ(宝酒造社製)を1単位添加し、12℃、16時間反応させた。前記の方法によりK53株のプロトプラストを作成し、このリガーゼ反応物を用いて形質転換を行った。カナマイシン耐性かつホモセリソ非要求性を示した形質転換株の1株からプラスミドDNAを前記の方法により調製した。

制限酵素Pst Iで切断し、アガロースゲル電気泳動で解析した結果、pChom20はpChom1のSal I 3.6キロベース挿入断片のうち第1図に示すPst I 1.0キロベース断片を含む目的の2.6キロベースの領域をサブクローニングしていることがわかった。

pChom20と命名したこのプラスミドDNAを用いて、K53株およびK54株を再度形質転換して調べたところ、HDおよびHK両遺伝子の相補能を有することが確認された。

HDおよびHK活性を、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.)、58, 311(1970)、同書71, 219(1972)に記載されている方法で測定した結果、K54株のpChom20形質転換株はpChom1形質転換株と同様に、K54株の1.6倍のHD活性を示し、K53株のpChom20形質転換株はpChom1形質転換株と同様に、K53株の1.7倍のHK活性を示した。この結果から、Sma IからPvu IIにいたる2.6キロベースの切断片上にHDおよびHK遺伝子が存在することがわかった。

(7) HDおよびHK両遺伝子を含むDNA切断片の塩基配列

pChom1およびpChom20にサブクローニングされたHDおよびHK両遺伝子を含むDNA切断片の全塩基配列をメソッズ・イン・エンザイモロジー101巻、20頁、1983年に記載されている方法を用いて決定した。すなわち、常法により制限酵素切断地図を作成したのち、M13ファージ・ベクターにサブクローニングして一本鎖DNAを調製し、ジオキシヌクレオチドによるチャーンターミネーション法により塩基配列を決定した。

第3表

CCGGGTTGATATTAGATTCTAAATAACTAAAGCTTGAGAGTTTTCGTTGAA	60
AACTAAAAAGCTGGGAAGGTGAATCGAATTTCGGGCTTTAAAGCAAAATGAAACGCTT	120
GGTCTATAGTGGCTAGGTACGGCTTTTGTGGACACATGTAAGGTGCCCCAACAGG	180
TAATAGGACACACACGCTCAACCGCGATTATTTGGAGAACATCATGCCATCTGC	240
CCCAAGCTTTAACCCCGCGCAAGGCTCCCGCTCAACGTCGAAATTGCCCTTTAGGATTC	300
GGAACAGTCGGCACTGAAAGTGTGCDTCTGATGACCGAGTACGGTATGAACTTGGCG	360
ArgleGluLeuThrGluGlyAspGluLeuAlaHis	
CGCATTGGTGGGCAACTGGAGGTTCTGGCATTGCTGTTCTGATATCTCAAAGCCACGT	420
ArgleGlyGlyProLeuGluValArgGlyIleAlaValSerAspIleSerLysProArg	
GAAGGCCTTGCACCTGAGGCTGCTCACTGAGGACGCTTTGGCACTCATCGAACGCCGAGGAT	480
GlutGlyValAlaProIleValLeuIleGluAspAlaPheAlaLeuIleGluAspGluAsp	
GTTGACATCDTCTGGAGGTATCGCCGGCATFGAGTACCCACGCTGAGGAGTGTCTCGCA	540
ValAspIleValGluValIleGlyGlyIleGluIleGluTyrProArgGluValValLeuIle	
GCTCTGAAAGCCGGCAAGCTGTTGCTACCGCCAATAAGGCTCTGGCAGATCACCT	600
AlaLeuLysAlaGlyIleSerValValThrAlaSerLysAlaLeuValAlaAspAlaSer	
GCTGAGCTTGGCTGATGCGACCGGAAACCTGATGCTGACTTCCGGCTGCGATGAGATCT	660
AlaGlyAlaLeuAlaAspAlaGluAlaAlaAsnValAspLeuTyrPheGluAlaAlaVal	
GCAGGCCTGCAATTCCAGTGCTGGGCCACTGCGCTCGTCCCTGGCTGGCGATGAGATCT	720
AlaGlyAlaIleProValValGlyProLeuArgArgSerLeuAlaGlyAspGlnIleGln	
TCTGTGATGGCATCCTAACGGCACCCACCTTCATCTTGGAGCCCATGGATTCCACC	780
SerValMetGlyIleValAspGlyThrAspAlaIleLeuAspAlaMetAspSerThr	
GGCGCTGACTATGCCAGATTCTTGGCTGAGGCAACTCGTTGGGTTACCCCGAAAGCTGAT	840
GlyAlaAspTyrAlaAspSerLeuAlaGlyAspAlaIleAspGlyTyrAlaGlyAspGlnIleGln	
CCAACTGCAGACGCTCGAAGGCCATGACGCCUCATCAAAGCTGCAATTGGCATECATC	900
ProThrAlaAspValGluGlyHisAspAlaAlaSerLysAlaAlaIleLeuAlaSerIle	

960

OCTTTTACACCCCGTGTACCGGGATGATGTACTGCCAGGTATCAGCAACATCAGC
AlaPheIleThrArgValIleAlaAspAspValIleCysGluGlyIleSerAlaLysSer
1020

OCTCCGACATTGAGGCACACAGCAGGCCAGGGCACACCATCAAGTTGGCCATCTG
AlaAlaAspIleGluAlaAlaAlaGlnGlnAlaGlyHisThrIleLeuLeuAlaIleCys
1080

GAGAGTCACCAACAAGAACGAAAGTCGGCTATTTTGTCTGCCDTCGACCCGACTCTA
GlyLysIleThrAsnLysIleIleLysSerAlaIleSerAlaAspValIleAspThrLeu
1140

TTACCTGTGTCCEACCCACTGGCOTCGGDTAAACAAAGTCTTAACTCAATCTTGTGGAA
LeuProValSerHisProLeuAlaSerValAlaLysSerPheAsnAlaIlePheValGlu
1200

GGAAAGCCACTGCTGCCGTGATGTTCTACGGAAACGGTTGCAAGTGGCCGCCAACGGT
AlaGlyAlaAlaGlyAlaGlyLeuAspPhePheIleGlyAlaGlyCysArgIlePheAlaGly
1260

CTGCTGTGCTTGGCAGCGCTGCTGGAGCCGACGAAACAGGTGCGAGGTGGCCCTGTC
LeuLeuCysLeuAlaThrSerLeuGluIleProAlaGluThrArgCysThrValAlaAlaVal
1320

CAGCTGCTTCCACCTACGCTTAACCTGCGGATGCTGTTCCGCTGAGACCAACTCGT
GlyValIleSerProPheIleLeuIleCysArgSerLeuIleSerValAlaAspPhePheVal
1380

ACACCTGACATGGATGGAGACATGGCTGGGGCTTTGGCTGAATTGGCTAACCGCT
ThrThrSerThrTrpMetIlePheIleAlaTrpAlaPheTrpLeuIleTrpLeuAlaCys
1440

TCTCTGAGCAAGGAAATCTCCCTGCGTAACACGAGGAAGGCGCAGATGATGCGA
SerLeuSerGluIleSerProCysValThrIleArgGlnGluIleIleAspAspAspAsp
1500

CGCTCTGATGTTGTCACCCACTCTGGCGCTGGAAATCTGATCTTCCCACCGCTTGAGCTG
ArgLeuValValValValValValValValValValValValValValVal
1560

CTGAAGGCTAAGGCTGTTTTAACGCAATCAACAGTGTGATCCGGCTGAAGGAGGACTAA
LeuLeuAlaLysProValValValAlaIleAsnSerValIleArgLeuGlyIleArgAspAsp
1620

TCTTACTGACATGGCAATTGAAACGCTGGCTGCTAAGGTTACCGTCAGCGTACCGAC
MetAlaIleGluLeuValValGlyArgLeuValThrValThrValIleProGly
1680

1680

ACTCTGAGCTGGAAATTATTCCTGCTGGCTGGAGCTGGCTGAGGTTGGCGAGGCGAA
ThrValGluValGluIleIleProSerGlyIleLeuGluValGluValValProGlyIleGly
1740

GGAGAGTCCCCCTTGTGCTGCTGGCTGGCTGGTTAACGCTTACGGCTGCTGATATGG
GlyGluValIleProLeuAspGlySerHisAlaLeuValValLysAlaIleArgAlaGlyLeu
1800

1860

GGAGCTGAGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
AlaAlaGlySerValValValValValValValValValProGlyIleGlyIleGly
1920

GGGGATTTTCCCTGACTCAAAGACGAGATGGTCAAGTGTGCTGCTGGCTGGCTGGCTGG
AlaAspPheProLeuIleGlyIleGlyIleValGluIleValGluIleSerSerAlaAspGly
1980

CCAGATAATGCTGCGCTTCTGCTGCGGACGAGTGGTGTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
ProAspAsnAlaIleAlaSerValIleLeuGlyGlyArgValValIleSerTrpThrAlaLeu
2040

ATCGACGGCAAGGECAGGECAGCAGTATGCTGCTGCTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
IleAspGlyLysSerGlnProGlyIleAlaValIleProLeuIleValGlnAspAspAlaIle
2100

CGTGCAGACTGCGCTGGCTCTAATTTCAGCATCCACCGAAAGCTGCGCCCGAGCTT
ArgAlaThrAlaLeuValIleProAspProHisAlaSerThrGluAlaValAlaArgGly
2160

CCAACCTGAAGTCACTCACATCGATGCGGCAATCTGCTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
ProIleGluValThrHisAlaAspAlaArgPheAsnValIleSerArgValAlaValMetIle
2220

GTTCGATTCGCAACGCGCTCTGATCTGCTGCTGGGGAGGACTGCTGCTGACCTGCGACCCAG
ValAlaLeuGlnGlnArgProAspLeuLeuTrpGlyGlyArgAspAlaGlyGly
2280

CCTTATCGTGCAGAAGTGTGCCCCTTACCTCGGATGCTGCTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
ProIleArgAlaGlyValLeuProValThrSerGluTrpValAsnArgLeuAspAsp
2340

GGCTATGCAAGCCTACCTTCCGGTGGCGCCCAACCGCCATGCTGCTGCTGGCTGGCTGG
GlyIleAlaAlaTyrLeuGlyIleAlaGlyProIleAlaMetValLeuSerThrGlyPro
2400

ATTCCAGACAAAGGTTGGAAAGATGCTGCTGAGTCTGCTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
IleProAspLysValLeuGluAspAlaArgGluSerGlyIleLysValLeuGly
2460

GTTCGCGGACCAGTCAGGTTGAAAGTTAACCAACCTTGGCCCAACAGGAGGCCCTT
ValAlaGlyProValIleValGluValValGlyProGly
2520

CGAAATCAAGAAGGGGCCCTTATAGTGGCAATTATCCTGCAACACGTGAACTCTACA
2580

GOTOCGGCCGGCCGTTAGTGGCTGGTTAGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
1 μlの2M NaClを加え、さらにS a l I
3単位を加え、37°Cで1時間反応させた後、反応物をアガロースゲル電気泳動にかけ、(6)に記した方法で1.2.5キロベースの断片を精製し、20 μlのHind III用反応液に溶解した。
両DNA切断片の溶液を混合し、5mM ATPを1 μlとT4リガーゼを1単位添加し37°Cで16時間反応させた。前記と同様にK54株のプロトプラスチック細胞を用いて形質転換を行った。カナマイシン耐性・スレオニン非要求性を示した形質転換株の一株から、プラスミドDNAを前記の方法で精製した。
pChom21と命名したこのプラスミドDNAはSal I 3.6キロベース断片のうちのHind III-Sal I 2.5キロベース断片をサブクローン化していることを制限酵素による解析で確認した。
K54株のpChom20あるいはpChom21保有株のHDおよびHK活性をジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 68, 311 (1970) および同書 71, 219 (1972) に記載されている方法で測定した結果、pChom21保有株のHD活性はpChom20の15分の1以下であったが、HK活性は6分の5以上保有され

pChom1 DNA 1 μlを含むHind III用反応液 (トリス10 mM, MgCl₂, 6 mM, NaCl, 60 mM, pH 7.5) 20 μlに Hind III (宝酒造社製) を3単位添加し、37°Cで60分間反応後、70°Cで15分間加温し反応を停止させた。これにデオキシATP, デオキシGTP, デオキシCTP, デオキシTTPを各0.05 mM 添加し、大腸菌DNAポリメラーゼI ラージフラグメント (宝酒造社製) を3単位加え、37°Cで30分間反応後、70°Cで15分間加温し反応を停止させた。これに1 μlの2M NaClを加え、さらにSal I (宝酒造社製) を3単位加え、37°C, 1時間反応させた後、反応物をアガロースゲル電気泳動にかけ、(6)に記した方法で2.5キロベースの断片を精製し、20 μlのHind III用反応液に溶解した。

一方、pCE54プラスミドDNA 1 μlを含むEcoRI用反応液 (20 μl) にEcoRIを3単位添加し、37°Cで60分間反応後、70°Cで15分間加温して反応を停止させた。これにデオキシATPとデオキシTTPを各0.05 mM 添加し、大腸菌DNAポリメラーゼI ラージフラグメントを3単位加え、37°Cで30分間反応させ、70°Cで15分間加温して反応を停止させた。これに

第 4 表

ていた。このことから、HDの完全発現にはHDの開始コドン上流75ベースに存在するHind III切断部位よりも上流の領域が必要であることが判明した。

第4表に示すように、HD遺伝子のオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流とHK遺伝子のオープン・リーディング・フレームの開始コドンの上流(HD遺伝子のオープン・リーディング・フレームのC末端領域)の120ベース以内に類似配列が存在し、これらの配列が両遺伝子の発現に必要である。さらにHK遺伝子のオープン・リーディング・フレームの終止コドンの下流の60塩基以内には第5表の下線部で示したステム・ループ構造をとる配列があり、コリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属に属する細菌の転写終止シグナルと考えられる。

第4表には上段にHD、下段にHKの配列を示してある。下線部が共通配列である。DNA配列の下に開始コドンから5残基目までのアミノ酸配列を示した。HK開始コドン上流のStopはHDの停止コドンを示している。

第5表には、HKのC末端DNA配列と4残基のアミノ酸配列を示してある。

Hind III

HD : CGATTATTTGGAGAACATGACCCAGCATCTGCCAAAGCTTAA
CCCCGGCAAGGTCCCCGC

HK : TCACCCACTCTGGCTGGAAATCTGATCTTCCGCACCCCTGAACCTG
TGAAAGCTAAGCTGTGTTG

TCAGCAGICGGAAATTGCCCTTTAGGATTGGAAACAGTCGGCACCTGAG
GTGATGCGCTGTGATGACC
MetArgLeuMetThr

TTAACCGAACATCAACAGTGTGATECGGCCTCGAAAGGGACTAAATTTACTGA
CATGGCAATTGAACTG Stop
MetAlaIleGluLeu

第 5 表

GTAAACCAACCTTAGGGCCAAACAAAGGAAAGCCCCCTTGAATCAAGAAGGGGGCCCTT
ValAsnGlnProStop

ATTAGTGAGCAA

発明の効果

本発明によれば、コリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属に属する微生物のスレオニン生合成に関与するHDおよびHKの遺伝情報を担うDNAとベクタープラスマドとの組換体DNAを保有させることにより、コリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種におけるL-スレオニンあるいはそれを前駆体として生合成されるL-イソロイシンの生産性を付与あるいは向上させることができる。

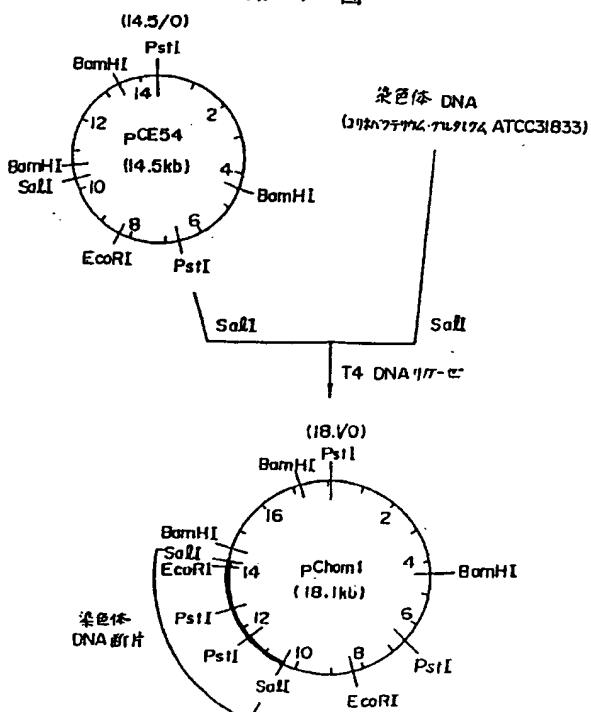
4. 図面の簡単な説明

第1図はpChom1の制限酵素Sal I, Pst I, Eco RIおよびBam HIの切断地図とその作製工程を示す。プラスミドの分子量はキロベース(Kb)で表示されている。pChom1の太い実線部分の染色体DNA断片上にHDおよびHK両遺伝子が含まれている。

第2図は、pChom1上にクローニングされた3.6キロベースのSal I切断片の代表的な制限酵素に対する切断地図を示す。

特許出願人(102)協和醸酵工業株式会社
代表者 加藤幹夫

第 1 図



第 2 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. *

識別記号

序内整理番号

//(C 12 P 13/08
(C 12 R 1:15)
(C 12 P 13/08
(C 12 R 1:13)
(C 12 N 1/20
(C 12 R 1:15)
(C 12 N 1/20
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/06
(C 12 R 1:15)
(C 12 P 13/06
(C 12 R 1:13)